

# **A Progeszteron-Indukálta Blokkoló Faktor szerepe a terhesség fenntartásában**

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Bogdán Ágnes**

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium

**Ph.D. PROGRAM: A-138 A REPRODUKCIÓ IMMUNOLÓGIAI VONATKOZÁSAI  
PROGRAM- ÉS TÉMAVEZETŐ: Dr. SZEKERES-BARTHÓ JÚLIA M.D., Ph.D., D.SC.**

**TÁRSTÉMAVEZETŐ: Dr. POLGÁR BEÁTA M.D., Ph.D.**

**DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE:**

**Dr. SZEKERES-BARTHÓ JÚLIA M.D., Ph.D., D.SC.**



Pécs, 2020

## Bevezetés

Az immunrendszer feladata a szervezet védelme a veszélyes, idegen antigénekkal szemben. Normális terhesség során a felerészben apai eredetű antigéneket kifejező magzat nem lökődik ki, mert az anya immunrendszere felismeri az apai antigének jelenlétét, és tolerálja azokat (1). A magzat megfelelő fejlődését biztosító immunológiai környezet anyai és magzati eredetű citokinek "párbeszéde" révén jön létre. Ennek a folyamatnak meghatározó szereplői a progeszteron, valamint – egy annak immunológiai hatásait közvetítő fehérje – a progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF).

### A PIBF

A magzati antigének felismerése után az aktiválódott anyai limfociták progeszteron receptort expresszálnak, a progeszteron kötődése a receptorhoz pedig a PIBF termelődéséhez vezet (2).

A PIBF fehérjét kódoló PIBF1 gén filogenetikailag konzervált, emberben a 13-as, egérben a 14-es kromoszómán található. Az egér PIBF1 génről a transzkripció során 16 különböző mRNS keletkezik, melyek közül a leghosszabb 'a' variáns 3677 bázispár (bp) hosszúságú, és 18 exont tartalmaz (3). A PIBF1 génről képződő teljes láncú fehérje 756 aminosavból áll, molekulatömege 89,6 kilodalton (kDa). Mivel a transzkripció során 16 különböző mRNS keletkezik, a fehérje esetében is eltérő izoformák jelennek meg. A teljes láncú PIBF, a CEP család tagjaként, a pericentrioláris szatellita komplexet alkotó fehérjék egyike, a centroszómához-asszociált formában, konstitutívan jelen van a sejtekben (4). Feltehetőleg a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet, valamint ez a forma befolyásolja a trophoblast és a tumorsejtek inváziós képességét. A kisebb splice-variánsok – mint pl. a 34 kDa molekulatömegű izoforma – a citoplazmában helyezkednek el és szekretálódnak, majd a PIBF receptoron keresztül egyrészt a JAK1/STAT6, másrészt a PKC/Ca<sup>2+</sup> jelátviteli utat aktiválják, melynek eredménye a Th2 típusú citokintermelés (5).

A fentiekből következően a PIBF terhesség során betöltött szerepe rendkívül szerteágazó. A szekretált PIBF az arachidonsav-felszabadulás gátlása mellett a progeszteron immunmoduláló tulajdonságait közvetíti, melyek a következők:

- Th2 citokin-túlsúly kialakítása,
- aszimmetrikus antitestek termelődésének fokozása,
- NK sejtek degranulációjának gátlása.

### Th2 citokin-túlsúly a terhesség alatt

A citokinek az immunválaszra gyakorolt hatásuk alapján pro-inflammatorikus (Th1), és anti-inflammatorikus (Th2) citokinekre oszthatók. A Th1 citokinek a celluláris immunválaszt segítik, a Th2 citokinek hatására pedig az ellenanyagtermelés fokozódik.

A terhességet a perifériás vérben Th2 citokin-túlsúly jellemzi. A placentában azonban, az embrió beágyazódása körüli időszakban lokális gyulladással környezetre van szükség, melyet elősegít az interferon gamma (IFN $\gamma$ ) és a leukémia inhibitor faktor (LIF) átmeneti fokozott expressziója.

A humán perifériás vérben található citokin mintázat és a terhesség kimenetele között összefüggés mutatható ki. Vetélő és koraszülő nők perifériás vérében jelentősen emelkedik a Th1 citokinek szintje.

*In vivo* egérkísérletek igazolják a Th1 citokinek terhességre gyakorolt káros hatását. Terhes egerek interleukin-2 (IL-2), tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) vagy IFN $\gamma$  kezelése a terhesség megszakadását eredményezi. Rezorbcióra hajlamos egértörzsek granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF), IL-3, vagy anti- TNF $\alpha$  kezelése csökkenti a magzati veszteséget (6).

A fentiek alapján a normális lefolyású terhességet Th2 citokin-túlsúly jellemzi, és a PIBF egyik fontos hatása a Th2 citokinek termelődésének fokozása (7).

#### Deciduális NK (dNK) sejtek és a PIBF degranulációt gátló hatása

A terhesség első trimeszterében a deciduális limfociták közel 60%-át az NK sejtek teszik ki, melyek mind fenotípusukat, mind funkciójukat tekintve eltérnek a perifériás vérben található NK sejtektől. A dNK sejtek többsége CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>, és bár tartalmaznak citotoxikus granulumokat, fő feladatuk a terhesség során a placentációhoz, implantációhoz és az embrió fejlődéséhez szükséges citokinek és angiogén faktorok termelése, valamint szükség esetén az intrauterin fertőzések leküzdése.

Egyes terhességi patológiákra jellemző az NK sejtek fokozott aktivitása (8). Habitualis vetélő nőkben emelkedett a dNK sejtek száma, továbbá vetélésből származó dNK sejteknél csökkent perforin tartalmat figyeltek meg, művi terhességmegszakításból származó NK sejtek perforin tartalmához képest. Ez utalhat arra, hogy ezek a sejtek degranulálódtak, és citotoxikus aktivitást fejtettek ki. Normális lefolyású terhesség során ezek a limfociták nem degranulálódnak, és így nem fejtenek ki citotoxikus aktivitást (9).

A PIBF-nek feltételezhetően szerepe van a degranuláció gátlásában. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a PIBF gátolja az NK aktivitást. A PIBF-deficiens egerekben megfigyelt fokozott rezorbció visszafordítható az NK sejtek depletálásával, ami azt jelzi, hogy a PIBF terhességvédő hatása az NK aktivitás kontrollálásán keresztül valósul meg (10).

*In vitro* körülmények között mind a progeszteron, mind a PIBF gátolja a perforin kiszabadulását az NK sejtek granulumaiból, ami - legalábbis részben – megmagyarázhatja a PIBF NK aktivitásra gyakorolt hatásának mechanizmusát.

## **Célkitűzések**

A PIBF terhességre, és az NK aktivitásra kifejtett hatásának további tisztázása céljából az alábbi feladatok elvégzését tűztük ki célként:

- A PIBF exon-expressziós mintázatának, valamint fehérje expressziós profiljának feltérképezése annak érdekében, hogy feltárjuk az esetleges összefüggéseket az eltérő PIBF izoformák és a terhesség normális vagy patológiás kimenetele között;
- A PIBF szerepének vizsgálata a dNK sejtek citotoxikus aktivitásának alacsony szinten tartásában.

## **Anyagok és módszerek**

A PIBF exon- és fehérje expressziós mintázatának vizsgálata céljából Balb/c egerekből a terhesség közepéről és végéről származó placenta, méh, valamint normál és rezorbeálódott magzati szöveteket izoláltunk, melyekből RNS- és fehérjetisztítást követően reverz transzkripció-polimeráz láncreakciót (RT-PCR) és Western blotot végeztünk.

A dNK sejtek vizsgálata céljából terhes CD1 egereket a terhesség különböző időpontjaiban (g.d. 7,5; g.d. 10,5; g.d. 12,5; g.d. 15,5) áldoztunk fel, az implantációs helyekből szövetmetszeteket készítettünk, és ezeken hisztokémiai és fluoreszcens reakciókkal vizsgáltuk az NK sejtek jellemzőit. Az alymphoid, valamint a csontvelő rekonstruált egerekből származó decidua metszeteket Dr. Anne Croy (Queen's University, Kingston, Ontario, Kanada) bocsátotta rendelkezésünkre.

## **Eredmények**

### A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata terhességhez asszociált szövetekben

Korábbi adatok szerint a PIBF jelenléte szükséges a terhesség zavartalan kiviseléséhez. A PIBF teljes láncú, és alternatív splicing révén számos kisebb izoformaként is kimutatható. A teljes hosszúságú (90 kDa) forma az invázió és a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet, míg a kisebb szekretált formák citokinszerű hatásuk révén befolyásolják az anya és magzata közti immunológiai kapcsolatot.

Célunk az volt, hogy feltérképezzük a PIBF mRNS expressziós mintázatát és a következményes PIBF fehérje izoformák megjelenését a terhességhez asszociált szövetekben, normális és patológiás egér terhességben. Az egyes exonok (Ex1-18) jelenlétét az egér terhesség 12-14. és 17-19. napján nyert placenta, méh, egészséges és rezorbeálódott magzati szövetekben RT-PCR

és agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. Ugyanezen szövetek lizátumaiban Western blot alkalmazásával feltérképeztük a különböző PIBF izoformák jelenlétét.

Mind a placentában, mind a méhszövetben nagyon hasonló exon expressziós mintázatot figyeltünk meg, gyakorlatilag minden exon jelen volt a terhesség közepén és végén is. Fehérje szinten ugyanakkor mindkét szövetben eltéréseket láthattunk. A minták többségében 4 fő PIBF izoforma volt jelen (90, 66, 55 és 34 kDa), és ezek előfordulása különbözött a terhességi korok és a szövetek között is. A placenta esetében valamennyi izoforma – különösen a 90 kDa molekulatömegű – mennyisége csökkent a terhesség végére. A méhszövet vizsgálata során változatosabb mintázatot találtunk. A 90 kDa molekulatömegű izoforma eltűnt a terhesség végére, az 55 kDa izoforma mennyisége csökkent, a 66 és 34 kDa-os variánsok esetében azonban emelkedést mutattunk ki a középidejű terhességhez képest. Átterhes egerek endometriumában a teljes láncú fehérje jelen volt, a nem terhes egerek endometriumából azonban hiányzott, ami arra utal, hogy ez az izoforma az endometrium terhességi átalakulását jellemzi, de a magzat jelenlététől függetlenül fejeződik ki.

A terhesség két időpontjából származó magzati mintáknál mRNS szinten jelentős eltéréseket figyeltünk meg. A középidejű magzatokból származó mintákban mind a 18 exon jelen volt. A PIBF N-terminális régióját kódoló 1-6., valamint 8-9. és 12. exonok a késői terhességből származó magzatok alacsonyabb %-ában voltak jelen.

Összevetettük a terhesség végéről származó egészséges, valamint rezorbeálódott magzatokból származó minták exon expressziós mintázatát. A rezorbeálódott magzatokban a 3. exon hiányzott, a fehérje N-terminális régióját kódoló 4-6. exonok, valamint a 10. exon előfordulása pedig drámaian csökkent a hasonló gesztációs korú egészséges magzatokhoz viszonyítva.

A különböző magzati minták lizátumainak Western blot analízise tükrözi az mRNS-szinten megfigyelteteket. A 12-14 napos magzatok lizátumaiban erősen expresszálódik a teljes láncú PIBF, melyben mind a 18 exon átíródott. A 17-19 napos magzatokban (melyekben a PIBF N-terminális régióját kódoló 1-6., valamint 8-9. és 12. exonok előfordulási gyakorisága csökkent), a teljes láncú PIBF minimális mennyiségben termelődik. A 66 kDa és 34 kDa molekulatömegű variáns mennyisége közel azonos a két mintacsoportban.

A késői terhességből származó rezorbeálódott magzatok fehérje expressziós mintázata hasonló az ugyancsak a terhesség végéről származó, egészséges magzatok esetében megfigyelthez. Ennek megfelelően, a rezorbeálódott magzatokban a 90 kDa fehérje egyáltalán nem, a 34 kDa izoforma csökkent mennyiségben termelődött. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy ezen izoformák jelenléte szükséges a terhesség fenntartásához.

## PIBF-pozitív dNK sejtek vizsgálata

Középidős egér terhességéből származó decíduákban NK sejt morfológiájú, a citoplazmatikus granulumban nagy mennyiségű PIBF-et tartalmazó sejteket mutattunk ki. Célunk ezen sejtek jellemzése és NK eredetük vizsgálata volt.

Első lépésként az említett sejtek limfocita eredetét igazoltuk, melyhez normál terhes, alymphoid Rag2<sup>-/-</sup>Il2rg<sup>-/-</sup> (NK-T-B-), valamint limfocita hiányos, csontvelő átültetéssel rekonstruált immunrendszerű egérből származó decíduákat vizsgáltunk. Normális lefolyású egér terhesség 12. napján a decíduában nagy számban vannak jelen PIBF+ granulumban tartalmazó sejtek. Az azonos terhességi korú limfocita hiányos egerek decíduájában ezen sejteket nem tudtuk kimutatni, ugyanakkor a csontvelő transzplantációval rekonstruált egerek decíduájában ismét megjelentek a jellegzetes NK morfológiát mutató, PIBF+ granulumban tartalmazó sejtek. Eredményeink arra utalnak, hogy ezek a sejtek a limfociták közé tartoznak.

Mivel az általunk kimutatott sejtek morfológiája nagyban hasonlít az NK sejtek jellegzetes, granulált megjelenésére, ezért következő lépésként a PIBF+ sejtek NK eredetét vizsgáltuk. Ehhez az egér dNK sejtek szöveti környezetben történő kimutatására alkalmas perjódsav-Schiff (PAS) és Dolichos biflorus agglutinin (DBA) lektin hisztokémiai reakciót alkalmaztunk. A PAS-reakció a dNK sejtek citoplazmatikus granulumaiban található glikoproteineket detektálja, a DBA lektin pedig terminális N-acetyl-D-galactosamine-t ismer fel, így a dNK sejtek plazmamembránjával és a citoplazmatikus granulumokkal egyaránt reakcióba lép. Mivel a DBA lektin nem reagál a keringő limfocitákkal, kizárólag a decídua NK sejtjeit jelöli, ezért specifikus dNK sejt markernek tekinthető. Az alkalmazott PAS-DBA kettős jelöléssel két sejtpopulációt azonosítottunk, melyeket 85%-ban kettősen pozitív (PAS+DBA+), és 15%-ban csak PAS+ (PAS+DBA-) sejtek alkottak. Megfigyeltük továbbá, hogy a sejtek szöveti eloszlása eltér. A PAS+DBA+ sejtek a decíduára korlátozódtak, míg a PAS+DBA- sejtek egy része ugyancsak a decíduában, többsége azonban a decídua alatt található spongiotrophoblast rétegben helyezkedett el. Utóbbi sejtpopuláció nem tartalmazott PIBF-et.

A PIBF és DBA ko-lokalizációjának vizsgálata céljából kettős fluoreszcens jelölést alkalmaztunk, és sikerült kimutatnunk, hogy a dNK sejtek citoplazmatikus granulumaiban mind a PIBF, mind a DBA jelen van.

Következő lépésként a dNK sejtek perforin tartalmát vizsgáltuk. Tizenkét és fél napos terhes egerek decídua metszeteit anti-perforin ellenanyaggal jelöltük, és nagy számú, perforin+ sejtet találtunk. Ezt követően PIBF és perforin esetében is elvégeztük a kettős fluoreszcens jelölést, és a dNK sejtek granulumaiban PIBF-perforin ko-lokalizációt mutattunk ki.

A PIBF+ sejtek aránya a DBA+ populáción belül, valamint a perforin+ sejtek aránya a PIBF+ populáción belül folyamatosan nőtt a terhesség előrehaladtával. Összevetettük továbbá a terhesség

közepéről származó kezeletlen terhes és progeszteron antagonistá RU486-al kezelt terhes egerekben is a sejtek arányát, és azt tapasztaltuk, hogy a kezeletlen egerekben a PIBF+ dNK sejtek 54%-a volt perforin+, míg az RU486 kezeléssel PIBF deficienssé tett egerekben a perforin+PIBF+ dNK sejtek aránya 100% -ra emelkedett.

## **Megbeszélés**

A PIBF a terhesség során sokoldalú és jelentős szerepet tölt be az anyai immunrendszer működésének megváltoztatásában, és a magzat fejlődése szempontjából kedvező immunológiai környezet kialakításában. Immunrendszerre gyakorolt hatásai közül a legjelentősebbek a citokin mintázat módosítása és az NK aktivitás gátlása (7,11).

A humán és az egér PIBF gén közötti 88%-os homológia és az egér rövid reprodukciós ideje miatt, ez a faj ideális modell a PIBF terhesség alatti hatásainak vizsgálatára.

A PIBF1 gén egérben 16 különböző mRNS-változat kódolásáért felelős, melyek közül a 18 exont tartalmazó 'a' variáns a leghosszabb. Erről íródik át a teljes láncú, 756 aminosavból álló, 89,6 kDa molekulatömegű PIBF. Sejten belüli lokalizációját tekintve a teljes láncú PIBF perinukleárisan, a centroszómahoz kötötten a mikrotubulusokhoz asszociálódva fordul elő. A sejtosztódás előtt a centroszóma megkettőződik, és mivel immunfluoreszcens jelöléssel a teljes láncú PIBF az osztódó sejtek két pólusán mutatható ki, feltételezhetően szerepet játszik a sejtosztódásban (12). Erre utalnak azon eredmények is, melyek a PIBF1-et a centroszóma aktív komponenseit alkotó CEP fehérjecsald tagjaként azonosították (4). A CEP fehérjék hiányában a mitotikus orsó hibásan működik, ami az osztódó sejten a kromoszómák helytelen elrendeződéséhez vezet, és végeredményben a sejtosztódás leállítását okozza. A teljes láncú PIBF fokozott expressziója elsősorban differenciálatlan és gyorsan proliferáló sejtekre (embrionális sejtek, daganatsejtek) jellemző, továbbá a PIBF-ről kimutatták, hogy a sejtinváziót szabályozásában vesz részt (14, 15).

Egérben a PIBF expressziója a terhesség előrehaladásával fokozódik, majd a születést megelőzően, a szervek és szövetek kialakulását követően a transzkripciója csökken, ezért feltehetően az embrionális sejtek differenciálódásának szabályozásában is részt vesz. Erre utalhatnak egerekben az ENU mutagenézis screennel végzett kísérletek eredményei is, melyek azt mutatják, hogy a PIBF1 génben történt pontmutáció a magzatok multiplex fejlődési rendellenességét és korai elhalását okozza (16).

A későbbiekben egymástól függetlenül több kutatócsoport, a 34 kDa molekulatömegű PIBF mellett további fehérje izoformákat azonosított, melyek mind ugyanarról a génről íródtak át. Lachmann és mtsai egér- illetve emberi eredetű, egészséges és tumoros szövetekben különböző mRNS variánsokat írtak le, melyek magukban foglalták a teljes láncú és a 34 kDa-os fehérje kódolásáért

felelős mRNS-eket is. Eredményeik azt mutatják, hogy a gén átíródása során komplex alternatív splicing mechanizmus működik, ami különböző méretű és funkciójú fehérje izoformák termelődését eredményezi (12).

A PIBF citokintermelésre és NK aktivitásra gyakorolt hatásai a 34-37 kDa molekulatömegű, szekretált izoformához köthetők. Ez a forma kimutatható normál terhességben a szérumban és vizeletben egyaránt, míg a patológiás terhességekre ennek a szekretált variánsnak a hiánya, illetve alacsony szintje jellemző (13).

Felmerült a kérdés, hogy van-e összefüggés az exon- és fehérje expressziós mintázat, és a terhesség sikeressége között, illetve, hogy mely exonok csökkent előfordulása vezethet a terhesség megszakadásához. Ezért különböző, a terhesség közepéről (12-14 nap) és végéről (17-19 nap) származó terhességhez asszociált egér szövetekben vizsgáltuk az egyes exonok előfordulási gyakoriságát és a fehérje izoformák expresszióját. mRNS szinten egyedül a magzati minták exon expressziós mintázatában figyeltünk meg eltérést a terhesség két időpontja között. Míg a 12-14 napos magzatokban mind a 18 exon 100%-ban jelen volt, addig a 17-19 napos magzatok esetében az exon 1-6., és exon 8-9. gyakorisága lecsökkent.

Ezután összehasonlítottuk a terhesség végéről származó egészséges és rezorbeálódott magzatok exon-expressziós profilját. A rezorbeálódott magzatokban szinte minden exon expressziójának gyakorisága jelentősen lecsökkent. Ez a jelenség különösen azon exonok esetében volt megfigyelhető, melyek a teljes láncú fehérje N-terminális részének kódolásáért felelősek. Rekombináns PIBF konstruktok (exon 2-9., exon 5-7., exon 8-9., exon 10-12. és exon 13-16.) funkcionális analízise a PIBF immunológiai aktivitását a molekula N-terminális részére helyezte (3), míg a centroszomális lokalizációért felelős aminosavak az exon 6-16. által kódoltak. Ezen korábbi eredmények fényében érthető az összefüggés a molekula N-terminális részén található exonok csökkent előfordulása és a magzati halálozás között, hiszen mind a citokintermelésre, mind az NK aktivitásra gyakorolt hatásért felelős izoformák az N-terminális szakaszon kódoltak. Ezen izoformák hiánya esetén nem alakul ki a terhességre jellemző, és a terhesség zavartalan lefolyásához szükséges Th2 domináns citokintermelés és a csökkent NK aktivitás, így a terhesség megszakad.

Fehérje szinten jelentősebb eltéréseket sikerült megfigyelnünk a vizsgált szövetek, és a terhesség eltérő időpontjai között.

A teljes láncú PIBF fokozott expressziója elsősorban differenciálatlan és gyorsan proliferáló sejtekre (embrionális sejtek, daganatsejtek) jellemző. Kutatásaink során kimutattuk, hogy ez a forma a középido magzatokban fokozott expressziót mutat, míg a szülést megelőzően szinte alig mutatható ki. Továbbá ezen izoforma mennyisége a rezorbeálódott, elhalt magzatokban szintén jelentősen csökkent, ami arra enged következtetni, hogy a teljes láncú fehérje termelődése a magzatban összefügg a terhesség kimenetelével.



A teljes láncú PIBF áterhes egerek méhszövetében is jelen volt, ami azt mutatja, hogy ez az izoforma a terhességi hormonok hatása alatt álló uterusban a magzat jelenlététől függetlenül is termelődik. A PIBF konstitutívan expresszálódik az endometrium mesenchymális őssejtjeiben, és a progeszteron kezelés fokozza ezen sejtek PIBF termelését (17).

Korábban felvetődött, hogy az alternatív splicing mellett, poszttranszlációs módosulások is felelősek lehetnek a PIBF expresszió változatosságáért (12). Saját eredményeink is ezt támasztják alá, mivel a szövetek Western blot analízisével olyan jellegzetes fehérje profilt mutattunk ki, ami az mRNS-szinten nyert eredmények alapján nem volt várható. Az eltérő izoformák nagy valószínűséggel különböző funkciókkal bírnak a terhesség során, és e tekintetben a molekula N-terminális részén található exonok által kódolt aminosavak jelentősek. Az N-terminális exonok hiányában egyrészt nem termelődik teljes láncú PIBF, ami a sejtciklus szabályozás zavaraihoz vezethet; másrészt az N-terminális exonok jelenléte szükséges az immunmoduláló funkcióval rendelkező kisebb izoformák termelődéséhez is.

A progeszteron és a PIBF terhességre kifejtett egyik hatása az NK aktivitás szabályozása. Mind emberben, mind egérben az NK sejtek teszik ki a deciduális limfociták 60-70%-át (20). Ezek a sejtek fenotípusosan és funkcionálisan is különböznek a perifériás vérben található NK sejtectől.

A legszembetűnőbb különbség a két NK sejt populáció között az, hogy míg a perifériás vérben található NK sejtek legjellemzőbb tulajdonsága a citotoxikus képességük, addig a dNK sejtek citotoxikus aktivitása alacsony, ugyanakkor aktív citokin és angiogén faktor termelésük révén elősegítik a decidualizációt, implantációt, és kedvező immunológiai környezetet teremtenek a magzat fejlődéséhez (18).

Meglepő a dNK sejtek alacsony citotoxicitása, hiszen az öléshez szükséges teljes fegyvertárral rendelkeznek. Keringő társaikhoz hasonlóan citoplazmatikus granulumaik vannak, melyek perforint, granzyme A-t és B-t tartalmaznak (19, 20). Ennek ellenére, normális lefolyású terhesség során nem töltnek be ölő funkciót.

Az egér dNK sejtek PAS és DBA reaktivitásuk alapján két alcsoportba oszthatók. A PAS+DBA- sejtek főleg IFN $\gamma$ -t termelnek, melynek az implantációban, később pedig a magzat megfelelő táplálásához szükséges anyai spirális artériák szerkezeti átalakításában van szerepe. A PAS+DBA+ kettős pozitív sejtek többnyire angiogén faktorokat (pl. VEGF és PGF) termelnek.

Az egér dNK sejtek ezen két alpopulációjának szövetbeli eloszlása eltérő. Az egér placenta és decida között határsávot képező spongiotrophoblastban kizárólag PAS+DBA- dNK sejtek találhatók, míg a deciduában mindkét alpopuláció jelen van, bár a kettősen pozitív sejtek jóval nagyobb mennyiségben. Tekintve, hogy csak a kettősen pozitív dNK sejtek mutattak PIBF pozitivitást, további kutatásaink ezekre a sejtekre korlátozódtak. Kimutattuk, hogy a PAS+DBA+ sejtek száma a terhesség

12.5 napján éri el a maximumot, majd fokozatosan csökken a terhesség előrehaladtával. A terhesség ezen időpontjában a kettős pozitív sejtek 67%-a expresszált PIBF-et, ami a citoplazmatikus granulumokban tárolódik, és a PIBF+ sejtek kb. fele perforint is tartalmazott. RU486 kezelés hatására a perforint tartalmazó NK sejtek aránya jelentősen növekedett, valamennyi PIBF+ NK sejt perforin+ is volt.

Az NK sejtek által kifejtett citotoxikus mechanizmusok potenciálisan károsíthatják a trophoblastot és a placenta leválását okozhatják. Bár nincs arra közvetlen bizonyíték, hogy az NK sejtek megtámadnák a trophoblastot, egyes terhességi patológiákkal fokozott dNK sejt aktivitás társul, ami arra utalhat, hogy létezik ilyen mechanizmus. Emberben a habituális vetélés során megfigyelhető a dNK sejtek mennyiségének emelkedése (21). Kimutatták továbbá, hogy patológiás terhességekben csökkent a deciduális limfociták perforin tartalma a normál terhességhez képest, ami arra utal, hogy a fokozott degranuláció vezetett a sikertelen terhességhez (22).

A dNK sejtek perforint, granzyme A-t és B-t expresszálnak (23). Bár bizonyos körülmények között, pl. spontán vetélés alkalmával, vagy humán cytomegalovírus-fertőzött autológ deciduális sejtek jelenlétében a deciduális sejtek képesek degranulálódni, normális lefolyású terhességben nem citotoxikusak. Korábban kimutattuk, hogy a PIBF gátolja a citotoxikus molekulák felszabadulását a dNK sejtek granulumáiból (26).

PIBF-el gátolható a perifériás vérből származó NK sejtek degranulációja. Anti-PIBF ellenanyag jelenlétében fokozódik a deciduális limfociták eredetileg alacsony NK aktivitása. A Balb/c egerekben az NK aktivitás egyidejű gátlása kivédte a rezorpciós arány anti-PIBF ellenanyag kezeléssel indukált fokozódását (10), ami azt feltételezi, hogy a PIBF az NK aktivitás alacsony szinten tartásával védi az egér terhességet. Ezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy a PIBF jelenléte a citoplazmatikus granulumokban hozzájárul a deciduális NK sejtek alacsony citotoxikus aktivitásához (11, 26).

Habituális vetélőkben összefüggés mutatható ki a dNK sejtek száma és az endometriális erek fejlettsége között, valamint megfigyelhető a CD16-CD56<sup>bright</sup> és CD16+CD56<sup>dim</sup> dNK sejtek arányának csökkenése. Azokban a betegekben, akik kromoszómálisan normális embriókat vetéltek el, a CD16-CD56<sup>bright</sup> dNK sejtek százalékos aránya alacsonyabb volt, mint egészséges terhésekben, vagy azokban a nőkben akik kromoszómálisan abnormális magzatot vetéltek el. Ezen adatok arra utalnak, hogy a normális terhesség egyik feltétele a dNK sejtek alacsony citotoxikus aktivitásának fenntartása.

Jelen munka során igazoltuk, hogy a dNK sejtek granulumáiban a perforin ko-lokalizálódik a PIBF-el, továbbá, hogy míg a progeszteron antagonistá RU486 hatására felére csökkent a PIBF+ dNK sejtek száma, egyidejűleg ezen sejtek közt nőtt a perforin+ sejtek aránya. Ezek az adatok alátámasztják, és legalábbis részben megmagyarázzák azokat a korábbi eredményeinket, melyek az NK aktivitás és a terhesség kimenetele közti összefüggést bizonyítják.

## **Összefoglalás**

Kimutattuk, hogy egérben a fokozott magzati rezorbciót a PIBF egyes exonjainak hiánya és a következményesen megváltozott PIBF fehérjetermelés jellemzi, tehát mind a teljes láncú PIBF, mind a kisebb izoformák termelődése szükséges a terhesség fenntartásához.

A PIBF jelenléte a potenciálisan citotoxikus dNK sejtek citoplazmikus granulumaiban hozzájárulhat azok ölképességének alacsony szinten tartásához, és így a terhesség normális lefolyásának biztosításához.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szekeres-Barthó Júlia professzor asszonynak munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatásáért. Hálás vagyok továbbá társtémavezetőmnek, Dr. Polgár Beátának, a sok segítségért és türelemért, mellyel a kérdéseimet megválaszolta.

Köszönettel tartozom Dr. Seress László professzor úrnak az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Czéh Boldizsárnak, hogy lehetővé tette számomra a NeuroLucida Version-7 szoftver használatát.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, valamint az Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium valamennyi munkatársának a hasznos tanácsaikat és segítségüket.

Szeretném megköszönni Dr. Szereday Lászlónak és Dr. Gőcze Péter professzor úrnak az előbírálattal gondos átolvasását, valamint véleményüket és tanácsaikat.

Végezetül köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak a támogatásukért.

## Irodalomjegyzék

- 1 Medawar BP: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1953; 7: 320.
- 2 Szekeres-Bartho J, Szekeres G, Debre P, Autran B, Chaouat G: Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 1990; 125(2):273-283.
- 3 Polgar B, Kispal G, Lachmann M, Paar C, Nagy E, Csere P, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J: Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J Immunol* 2003; 171(11): 5956–5963.
- 4 Kim K, Lee K, Rhee K: CEP90 is required for the assembly and centrosomal accumulation of centriolar satellites, which is essential for primary cilia formation. *PLoS One* 2012; 7(10): e48196.
- 5 Kozma N, Halasz M, Polgar B, Poehlmann TG, Markert UR, Palkovics T, Keszei M, Par G, Kiss K, Szeberenyi J, Grama L, Szekeres-Bartho J: Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J Immunol* 2006; 176(2):819-826.
- 6 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7): 353-356.
- 7 Szekeres-Bartho J, Wegmann TG: A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol* 1996; 31(1-2): 81-95.
- 8 Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, Bulmer J: Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Hum Reprod* 2009; 24:45–54.
- 9 Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER: Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:394–404.
- 10 Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay G, Smart YC, Volgyi Z: The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cellular Immunology* 1997; 177:194–199.
- 11 Laskarin G, Strbo N, Sotosek V, Rukavina D, Faust Z, Szekeres-Bartho J, Podack ER: Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42(5):312-320.
- 12 Lachmann M, Gelbmann D, Kálmán E, Polgár B, Buschle M, Von Gabain A, Szekeres-Barthó J, Nagy E: PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer* 2004; 112(1):51-60.
- 13 Polgár B, Nagy E, Mikó E, Varga P, Szekeres-Barthó J: Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod* 2004 71(5):1699-705.
- 14 Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arato G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Bartho J: Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol* 2011; 90:50-7.

- 15 Halasz M, Polgar B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Bartho J: Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(23):4617-30.
- 16 Hagarman JA, O'Brien TP: An essential gene mutagenesis screen across the highly conserved piebald deletion region of mouse chromosome 14. *Genesis* 2009; 47:392-403.
- 17 Kyurkchiev DS, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev SD: Effect of progesterone on human mesenchymal stem cells. *Vitam Horm* 2011; 87:217-37.
- 18 Redhead ML, Portilho NA, Felker AM, Mohammad S, Mara DL, Croy BA: The transcription factor NFIL3 is essential for normal placental and embryonic development but not for uterine natural killer (uNK) cell differentiation in mice. *Biol Reprod* 2016; 94(5):101.
- 19 Quillay H, El Costa H, Duriez M, Marlin R, Cannou C, Madec Y, de Truchis C, Rahmati M, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, Menu E: NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* 2016; 13(1):39.
- 20 Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov HD, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL: Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198:1201-12.
- 21 Quenby S, Farquharson R: Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:24-8.
- 22 Gulan G, Podack ER, Rukavina D, Gudelj L, Rubesa G, Petrovic O: Perforin-expressing lymphocytes in peripheral blood and decidua of human first-trimester pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:9-18.
- 23 Bogovic Crncic T, Laskarin G, Juretic K, Strbo N, Dupro J, Srsen S, Randic L, Le Boutellier P, Tabiasco J, Rukavina D: Perforin and Fas/FasL cytolytic pathways at the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54:241-8.
- 24 Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Le Boutellier P, Jabrane-Ferrat N: Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* 2013; 9(4):e1003257.
- 25 Lima PD, Tu MM, Rahim MM, Peng AR, Croy BA, Makrigiannis AP: Ly49 receptors activate angiogenic mouse DBA+ uterine natural killer cells. *Cell Mol Immunol* 2014; 11(5):467-76.
- 26 Faust Zs, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J: Progesterone induced blocking factor inhibits degranulation of NK cells. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42:71-75.

## Saját közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Bogdan A**, Polgar B, Szekeres-Bartho J: Progesterone induced blocking factor isoforms in normal and failed murine pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71(2): 131-136. **IF: 2,438**

**Bogdan A**, Berta G, Szekeres-Bartho J: PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J Reprod Immunol* 2017; 119: 38-43. **IF: 2,322**

### Az értekezés témájához kapcsolódó impakt faktoros közlemények

Segerer SE, Martignoni F, **Bogdan A**, Muller N, Kapp M, Dietl J, Rieger L, Kammerer U: Thrombopoietin modulates the proliferation, migration and cytokine profile of decidual cell subsets during early gestation. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(6): 361-368. **IF: 3,483**

Mori M, **Bogdan A**, Balassa T, Csabai T, Szekeres-Bartho J: The decidua - the maternal bed embracing the embryo - maintains the pregnancy. *Semin Immunopathol* 2016; 38(6): 635-649. **IF: 5,296**

Meggyes M, Szereday L, Jakso P, Bogar B, **Bogdan A**, Nörenberg J, Miko E, Barakonyi A: Expansion of CD4 phenotype among CD160 receptor-expressing lymphocytes in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2017; 78(6). doi: 10.1111/aji.12745. Epub 2017 Sep 16. **IF: 2,745**

Pallinger E, Bognar Z, **Bogdan A**, Csabai T, Abraham H, Szekeres-Bartho J: PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Sci Rep* 2018; 8(1): 4662. **IF: 4,122 (2017)**

**Összesített IF: 20,406**

### A témához kapcsolódó egyéb közlemények

**Bogdán Ágnes**, Polgár Beáta, Szekeres-Barthó Júlia: A progeszteron-indukálta blokkoló faktor szerepe a terhesség fenntartásában. *EGÉSZSÉG-AKADÉMIA* 2014; 5(4): 254-258.

## **A témához kapcsolódó könyvfejezet**

Julia Szekeres-Bartho, Melinda Halasz, Beata Polgar, **Agnes Bogdan**: Immuno Endocrine Interactions: An Example; Progestagen Treatment for Threatened and Recurrent Abortion and Molecular Mechanisms. In: Gérard Chaouat, Olivier Sandra, Nathalie Lédée (szerk.) Immunology of Pregnancy 2013. Online kiadás: Bentham Science Publishers Ltd., 2013. pp. 614-624.

## **Egyéb impakt faktoros közlemények**

Bányai K, Forgách P, Erdélyi K, Martella V, **Bogdán A**, Hocsák E, Havasi V, Melegh B, Szucs G: Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry. *Virus Res* 2005; 113(2): 73-80. **IF: 2,562**

Bányai K, Jiang B, **Bogdán A**, Horváth B, Jakab F, Meleg E, Martella V, Magyar L, Melegh B, Szucs G: Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol* 2006; 37(4): 317-322. **IF: 2,630**

Bányai K, **Bogdán A**, Kisfali P, Molnár P, Mihály I, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szücs G: Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(6): 916-919. **IF: 5,775**

Bányai K, Martella V, **Bogdán A**, Forgách P, Jakab F, Meleg E, Bíró H, Melegh B, Szucs G: Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J Gen Virol* 2008; 89(2): 534-539. **IF: 3,092**

Bányai K, **Bogdán A**, Domonkos G, Kisfali P, Molnár P, Tóth A, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G: Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J Med Virol* 2009; 81(2): 362-370. **IF: 2,470**

Bányai K, **Bogdán A**, Szücs G, Arista S, De Grazia S, Kang G, Banerjee I, Iturriza-Gómara M, Buonavoglia C, Martella V: Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: a rapid and reproducible assay for strain surveillance studies. *J Med Microbiol* 2009; 58(3): 303-311. **IF: 2,272**

Bányai K, Kisfali P, **Bogdán A**, Martella V, Melegh B, Erdman D, Szucs G: Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(8): 997-999. **IF: 2,605**

Bányai K, Gentsch JR, Martella V, **Bogdán A**, Havasi V, Kisfali P, Szabó A, Mihály I, Molnár P, Melegh B, Szücs G: Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a hungarian study. *J Infect Dis* 2009; 200 Suppl 1: S222-227. **IF: 5,865**

**Összesített IF: 27,271**

**Kumulatív IF: 47,677**